12 月 December
2019, 62(12): 1379 – 1391
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2019. 12. 004

牧草盲蝽实时定量 PCR 内参基因的筛选

贾 冰[1], 马 亿[1], 庞保平[1], 单艳敏[2], 鲍青龙[3], 韩海斌[4], 谭 瑶[1,*]

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古草原工作站, 呼和浩特 010020;
3. 赤峰市草原工作站, 内蒙古赤峰 024000; 4. 中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010019)

摘要:【目的】筛选出适合牧草盲蝽 *Lygus pratensis* 在不同条件下稳定表达的内参基因。【方法】选取编码牧草盲蝽 α-微管蛋白、β-微管蛋白、肌动蛋白、延伸因子、琥珀酸脱氢酶复合体 A、泛素、转录起始因子 TFIID 亚基、谷胱甘肽 S-转移酶、核糖体蛋白 L32 及 TATA 盒结合蛋白的 10 条基因为候选内参基因, 采用 qRT-PCR 技术测定其在牧草盲蝽不同性别成虫、成虫不同组织、不同龄期、对功夫菊酯不同抗性成虫、不同温度及不同杀虫剂分别处理后的成虫共 6 类样品中的表达量; 采用 BestKeeper, geNorm, NormFinder 及 RefFinder 4 种计算程序对各候选基因的表达稳定性进行评价。【结果】依据获得的有效 qRT-PCR 数据前提, 利用不同计算方法综合分析得出: 在牧草盲蝽成虫不同组织中和对功夫菊酯不同抗性成虫中最稳定表达的内参基因均为 *RPL32*; 不同温度处理、不同性别成虫中、不同杀虫剂处理和不同龄期牧草盲蝽中最稳定表达的内参基因分别为 *UBQ*, *SDHA*, *β-tubulin* 和 *TAF*。通过 geNorm 软件判断配对变异数确定的内参基因最佳数目, 结合 RefFinder 对基因表达稳定性综合排序的结果可得: 牧草盲蝽不同成虫组织中、不同性别成虫中、不同龄期、对功夫菊酯不同抗性成虫中、不同温度及杀虫剂分别处理的成虫等各组的最优内参基因组合分别为 *RPL32* + *TAF*, *SDHA* + *GST*, *TAF* + *GST* + *UBQ*, *RPL32* + *GST*, *UBQ* + *ACT* + *β-tubulin* 和 *β-tubulin* + *TAF* + *RPL32*。【结论】本研究获得的牧草盲蝽在不同条件下表达最稳定及最适内参基因组合, 都可用于后续的基因定量表达研究。

关键词: 牧草盲蝽; qRT-PCR; 内参基因; 基因表达分析; 表达稳定性
中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)12-1379-13

Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae)

JIA Bing[1], MA Yi[1], PANG Bao-Ping[1], SHAN Yan-Min[2], BAO Qing-Long[3], HAN Hai-Bin[4], TAN Yao[1,*] (1. Research Center of Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China; 2. Inner Mongolia Grassland Station, Hohhot 010020, China; 3. Chifeng Grassland Station, Chifeng, Inner Mongolia 024000, China; 4. Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010019, China)

Abstract:【Aim】To screen out the most stably expressed reference genes in *Lygus pratensis* under specific conditions.【Methods】qRT-PCR was adopted to determine expression levels of 10 candidate reference genes including alpha-tubulin, beta-tubulin, actin, elongation factor, succinate dehydrogenase, ubiquitin, transcription initiation factor TFIID subunit, glutathione S-transferase, ribosomal protein L32, and TATA-box binding protein genes in six categories of samples of *L. pratensis* including different sex adults, different adult tissues, different developmental stages, adults with different

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560519); 中国博士后科学基金项目(155582); 内蒙古青年科技英才支持计划(NJYT-19-B22)
作者简介: 贾冰, 女, 1993 年 1 月, 内蒙古赤峰市人, 硕士研究生, 主要从事牧草害虫发生与综合防治研究, E-mail: jiabing22930@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: 850310.tanhuaf4@163.com
收稿日期 Received: 2019-06-18; 接受日期 Accepted: 2019-10-11

lambda-cyhalothrin resistance, and adults respectively exposed to different temperatures and different insecticides. BestKeeper, geNorm, NormFinder and RefFinder were adopted to analyze the mRNA expression stability of the candidate reference genes. 【Results】 According to the results of different analysis methods based on the effective qRT-PCR data, it was concluded that the most stably expressed reference gene was *RPL32* for different adult tissues and adults of *L. pratensis* with different lambda-cyhalothrin resistance. The most stably expressed reference genes for the groups of adults exposed to different temperatures, different sex adults, adults exposed to different insecticides and different developmental stages were *UBQ*, *SDHA*, *β-tubulin* and *TAF*, respectively. Based on the comprehensive analysis from geNorm and RefFinder calculation, the best combinations of stably expressed reference genes for the groups of different adult tissues, different sex adults, different developmental stages, adults with different lambda-cyhalothrin resistance, and adults exposed to different temperatures and different insecticides were *RPL32* + *TAF*, *SDHA* + *GST*, *TAF* + *GST* + *UBQ*, *RPL32* + *GST*, *UBQ* + *ACT* + *β-tubulin* and *β-tubulin* + *TAF* + *RPL32*, respectively. 【Conclusions】 All the most stably expressed reference genes and their best combinations obtained from this study could be acceptable as reference genes for gene expression analysis in *L. pratensis* for future studies.

Key words: *Lygus pratensis*; qRT-PCR; reference gene; gene expression analysis; expression stability

牧草盲蝽 *Lygus pratensis*，属半翅目(Hemiptera)盲蝽科(Miridae)盲蝽亚科(Mirinae)(王伟等, 2016)，为害棉花、豆类、玉米、小麦、蔬菜等作物(孙鹏等, 2017)。在我国西北地区，牧草盲蝽主要为害棉花和苜蓿等经济作物(Zhang *et al*., 2017)，严重影响植株的正常发育，造成作物产量和品质的下降(杨明超和杨涛, 2001)。由于其隐蔽危害的特性，防治极容易被忽视。近年来，随着北方农牧交错地区紫花苜蓿的集约种植，及西北地区棉花品种的更新换代，牧草盲蝽在田间的发生趋势加重，也越来越受到植保界的关注(张孝峰, 2014; 谭瑶等, 2015)。牧草盲蝽在欧洲、北非、中东、印度北部、中国和西伯利亚都有发现(Zhang *et al*., 2017)。但在我国，牧草盲蝽的研究相对较少，多集中于牧草盲蝽的生物学特性研究。因此，了解牧草盲蝽生理及行为的分子机制有助于制定科学合理的防控技术。

实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术是一种快速高效、易重复，且具有高度灵敏性和准确性的核酸定量测定技术，是植物学、动物学、农学、食品安全等科研领域中研究基因表达水平的重要手段(王光华等, 2008; 朱捷等, 2009; Li *et al*., 2013)。在进行 qRT-PCR 过程中，为确保定量结果的准确性，实现对不同样品的归一化及校正，引入内参基因不可或缺(Lu *et al*., 2013; Taylor *et al*., 2016; Dzaki *et al*., 2017)。内参基因通常选自持家基因，持家基因常具备不受外界因素影响，表达稳定的特点(张玉芳等, 2014)。近年来的研究证明，持家基因在不同条件下的表达并非绝对稳定，而是在一定范围内的恒定(Gutierrez *et al*., 2008; Van Hiel *et al*., 2009; Tan *et al*., 2017; Lü *et al*., 2018)。因此，在不同条件下应先确定其内参基因的稳定性，选取最适的内参基因进行实验分析，开展筛选稳定表达的内参基因工作十分必要。为了针对牧草盲蝽开展后续的基因表达和功能研究，本研究基于转录组测序鉴定出 α-微管蛋白(Alpha-tubulin)基因 *α-tubulin*、β-微管蛋白(Beta-tubulin)基因 *β-tubulin*、肌动蛋白(Actin)基因 *ACT*、延伸因子(elongation factor)基因 *EF*、琥珀酸脱氢酶复合体 A (succinate dehydrogenase)基因 *SDHA*、泛素(ubiquitin)基因 *UBQ*、转录起始因子 TFIID 亚基基因 *TAF*、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase)基因 *GST*、核糖体蛋白 L32 (ribosomal protein L32)基因 *RPL32* 及 TATA 盒结合蛋白(TATA-box binding protein)基因 *TATA-box* 10 条持家基因，并在不同条件下对其表达稳定性进行了分析，为以后在对牧草盲蝽相关基因表达水平的研究中提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2016 年 4 月下旬在内蒙古呼和浩特市和林县沙尔沁乡中国农业科学院草原研究所苜蓿种植基地扫网捕获牧草盲蝽，用新鲜四季豆在人工气候箱中连续饲养，饲养条件为：温度 25 ± 1℃，相对湿度：

50% ±10% ,光周期 16L∶8D(贾冰等, 2018)。分别收集牧草盲蝽 3 日龄成虫头、胸、腹作为不同组织样品。收集牧草盲蝽 3 日龄成虫,分别于 15, 18, 21, 24, 27 和 30℃处理 2 h 后,置于液氮中。分别收集牧草盲蝽 3 日龄雌、雄成虫。收集牧草盲蝽 3 日龄成虫,分别使用 0.39 μmol/L 吡虫啉、0.12 μmol/L 阿维菌素、0.34 μmol/L 辛硫磷、0.22 μmol/L 功夫菊酯及 0.52 μmol/L 灭多威,采用玻璃管药膜法处理成虫 1 h,以作为不同杀虫剂处理样品。分别收集蜕皮 1 d 的牧草盲蝽 1 -5 龄若虫和 3 日龄成虫,作为不同龄期样品。参考室内抗药性筛选的方法报道(Zhang *et al*., 2007),将羽化 3 日龄成虫用能杀死种群 60% 的功夫菊酯进行处理,24 h 后存活的个体进行继代饲养,在室内连续筛选 14 代,选取敏感品系 S,抗性品系 R6 和 R14 作为不同抗性成虫样品。

实验中每个处理取 3 个重复,每个重复 20 头试虫,并将所有样品置于液氮中冻存,储存于 -80℃下用于总 RNA 提取。

1.2　主要试剂与仪器

按 TaKaRa Mini RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 大连)的要求提取总 RNA, 高质量的 RNA 按 PrimeScript 1st Strand cDNA 合成试剂盒(TaKaRa, 大连)提供的说明书进行 cDNA 第 1 链的合成, PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)和 Ex-Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司。实验中超微量紫外分光光度计(NanoPhotometer P-Class 6453, Impien GmbH, Munich, 德国)用于测定核酸纯度和浓度, PCR 仪(BIO-RAD T100 Thermal Cycler, Bio-RAD, 美国)、荧光定量 PCR 仪(FTC-3000P Real-Time Quantitative Thermal Cycler, Funglyn Biotech, 加拿大)分别用于基因扩增和定量扩增等。

1.3　牧草盲蝽总 RNA 提取及 cDNA 的合成

取 1.1 节牧草盲蝽各样品(成虫样品取 3 头、不同龄期若虫取 20 mg),充分研磨后严格按照 TaKaRa Mini RNA 试剂盒说明书提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,微量分光光度计测定样品浓度与纯度,并按照 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书进行反转录,合成 cDNA 第 1 链,并在 -20℃条件下储存,用于后续 qRT-PCR 检测。

1.4　内参基因的选择、鉴定与引物设计

参考常用昆虫内参基因(杨顺义等, 2013; 王佳等, 2014; 张玉芳等, 2014; 张家炜等, 2018),选取牧草盲蝽转录组测序结果中注释基因 *α-tubulin*, *β-tubulin*, *ACT*, *EF*, *SDHA*, *UBQ*, *TAF*, *GST*, *RPL32* 和 *TATA-box* 作为候选内参基因,采用 Primer 5.0 软件设计 RT-PCR 特异性引物,经 PCR 扩增获得特异性条带后,对其进行克隆、测序和比对,以确定准确的候选内参基因序列。采用 Primer 3.0 在线软件设计 qRT-PCR 引物,以 1.3 节提取的 cDNA 10 倍浓度梯度稀释后为模板,通过 qRT-PCR 仪绘制每对引物的溶解曲线与梯度浓度扩增的标准曲线,以检测每对引物的扩增特异性、扩增效率及标准曲线的决定系数 R^2(表 1)。

1.5　qRT-PCR 检测内参基因的表达量

利用 1.3 节合成的 cDNA 作为模板进行 qRT-PCR,PCR 反应体系(10 μL):荧光染料 GoTaq® qPCR Master Mix 5 μL, Nuclease-free Water 3.6 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL, cDNA 样品(0.1 μg/μL)1 μL。PCR 反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min,共 40 个循环;最后在 94℃ 30 s, 60℃ 90 s 和 94℃ 10 s 条件下分析熔解曲线以确认引物的特异性。各样品设 3 个生物学重复和 3 次技术重复。

1.6　数据分析

利用所有生物学重复 qRT-PCR 实验得到 Ct 值计算基因 Ct 平均值,根据得到的每个基因的 Ct 平均值进行下一步分析。应用 BestKeeper, geNorm 和 NormFinder 评估 10 条内参基因的稳定性。BestKeeper 是以获得每个基因之间产生配对的相关系数(r)、标准差(SD)和变异系数(CV)来评定基因的稳定性,相关系数越大、标准差和变异系数越小,内参基因越稳定;反之,稳定性越差。geNorm 程序通过计算出每个内参基因稳定性的 M 值来筛选出稳定性较好的内参基因,判定标准为 M 值越小内参基因越稳定,反之,则稳定性越差。还可通过 geNorm 计算配对变异 V 值,通过 Vn/Vn +1 确定所需内参基因的最适数目。如果 Vn/Vn +1 >0.15,则需加入 1 个新的内参基因,如果 Vn/Vn +1 <0.15,维持原有的内参基因数目,而 0.15 则作为是否加入新内参基因的临界值(Liang *et al*., 2014; Tan *et al*., 2017)。NormFinder 的计算原理与 geNorm 相似,也是先获得内参基因表达稳定值,再根据稳定值筛选出最适的内参基因,稳定值越小则越稳定。最后利用在线软件 RefFinder 对上述 3 种方法分析得到的稳定性进行综合分析,求几何平均值,最终得到综合排名指数。

表 1　qRT-PCR 引物信息
Table 1　Primer information for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequence	产物长度(bp) Product size	Tm (℃)	扩增效率(%) Amplification efficiency	决定系数 R^2 Determination coefficient	斜率 Slope
α-tubulin	F: CGGTCATTTGCTCGTGGTAG R: CGAGGCCATCTACGACATCT	245	60	111.53	0.9957	-3.074
β-tubulin	F: GCCGAATCCAACATGAACGA R: AATTGCAGACTTGGCGTTGT	159	60	96.46	0.9981	-3.410
ACT	F: TCAGATCTTCGGGGTCCAAC R: AGGTCTTCTTCTCTGGTGCC	239	60	107.05	0.9988	-3.164
EF	F: ATTGCCACACTGCTCACATC R: GTCTGTCTCATGTCACGCAC	234	60	101.53	1.0000	-3.286
SDHA	F: AGTACGGAAAGGGTGGTCAG R: TTTTGGCTCTGAACCTGTGC	228	60	96.92	0.9992	-3.398
UBQ	F: CCAACGAGTCTTTGTCTGCC R: TGGCAGAAGGTCAGGAGAAG	198	60	94.89	0.9789	-3.451
TAF	F: TGTAGCGGGCTGACACTTTA R: GCGCTTGGAGTTCACAGTAG	156	60	90.67	0.9973	-3.568
GST	F: TGATCGTCACTGGCTCGTAA R: CAGTCAGTTGGGCAGGGATA	192	60	107.71	0.9966	-3.150
RPL32	F: ACCACTCGTTTGCCATTGAC R: CTGGAAACCACTAGTCCCCA	237	60	99.24	0.9998	-3.340
TATA-box	F: CATCCATCCAAGTCCAAGCG R: TCCACATCGTTCACACTGGA	153	60	97.96	0.9982	-3.372

2　结果

2.1　候选内参基因的表达谱

以牧草盲蝽 cDNA 按 10 倍浓度进行梯度稀释后为模板,通过标准曲线的绘制得出引物的扩增效率为 90.67% ~111.52%,除 *UBQ* 外,相关系数 R^2 值均高于 99.50%,说明标准曲线线性关系良好(表 1)。候选内参基因引物扩增的熔解曲线大都只有明显的单一峰,说明所用引物特异性较好。内参基因的表达丰度是内参基因的首要筛选条件,由本研究中 6 类样品中各候选内参基因 Ct 值变化情况(表 2; 图 1)可知:*EF* 基因的表达丰度(Ct 值)最大,*GST* 和 *TATA-box* 的表达丰度(Ct 值)相对最低,所有 10 条候选基因 Ct 值中位数都处于 15 ~25 之间(图 1)。Ct 值变异大小也是内参基因的重要筛选条件,图 1 结果显示 Ct 值差异由大到小依次为:*TATA-box*(24.92) > *GST*(24.83) > *TAF*(24.13) > *α-tubulin*(22.04) > *RPL32*(21.93) > *UBQ*(21.30) > *ACT*(21.04) > *SDHA*(20.08) >*β-tubulin*(19.85) >*EF*(15.57)。

2.2　应用 BestKeeper 软件分析候选内参基因的表达稳定性

通常 BestKeeper 分析所得的基因 *SD* 值小于 1 时,都可以作为相对定量的内参基因来使用(李晓等, 2018)。BestKeeper 软件根据 Ct 值的标准差来分析基因的稳定性,由结果可以看出,不同成虫组织中最稳定表达的基因为 *RPL32*,除 *ACT*, *SDHA* 和 *α-tubulin* 外,其他候选基因的 *SD* 值 <1;不同温度处理组,最稳定表达的基因为 *UBQ*,该组均为 *SD* >1;不同性别成虫中最稳定表达的基因为 *TAF*,除 *ACT* 和 *TATA-box* 外,其他候选基因均为 *SD* <1;不同杀虫剂处理组相对表达最稳定的基因为 *RPL32*,*SD* > 1;不同龄期组最稳定表达的基因为 *ACT*,该组均为 *SD* >1;而功夫菊酯抗性组中最稳定表达的基因为 *RPL32*,该组所有基因均为 *SD* <1(表 3 和 6)。

2.3　应用 geNorm 软件分析候选内参基因的表达稳定性

应用 geNorm 分析,一般 M 值越小表达越稳定(Tan *et al*., 2017)。结果表明,成虫不同组织中 M 值排序为:*ACT* > *SDHA* > *α-tubulin* > *GST* > *TATA-box* >*β-tubulin* > *UBQ* > *EF* > *RPL32* > *TAF*;不同温度处理组 M 值排序为:*EF* > *α-tubulin* > *TATA-box* > *GST* > *TAF* > *RPL32* > *SDHA* > *β-tubulin* > *ACT* > *UBQ*;不同性别成虫组 M 值排序为:*TATA-box* > *ACT* > *UBQ* > *α-tubulin* > *β-tubulin* > *RPL32* > *TAF* > *GST* > *EF* > *SDHA*;不同杀虫剂处理组 M 值排序为:

表 2　不同样品或处理下牧草盲蝽各候选内参基因的 Ct 值(平均值 ± 标准差)

Table 2　Ct values (mean ± *SD*) of candidate reference genes of *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments

基因 Gene	组织 Tissue	温度 Temperature	性别 Sex	杀虫剂处理 Insecticide treatment	龄期 Developmental stage	功夫菊酯抗性 Lambda-cyhalothrin resistance
ACT	19.37 ± 1.43	22.63 ± 2.15	19.52 ± 1.37	18.41 ± 2.62	27.72 ± 3.35	19.62 ± 0.85
EF	14.70 ± 0.72	18.81 ± 2.49	14.49 ± 0.48	15.39 ± 2.46	22.66 ± 3.95	15.47 ± 0.36
α-tubulin	21.06 ± 1.24	25.10 ± 2.76	20.13 ± 1.11	21.50 ± 3.40	25.54 ± 3.57	21.69 ± 1.04
β-tubulin	19.03 ± 1.04	22.15 ± 1.99	19.02 ± 0.48	18.46 ± 2.32	25.52 ± 3.39	19.01 ± 0.67
GST	24.31 ± 0.63	27.24 ± 2.12	24.17 ± 0.52	24.73 ± 2.73	31.20 ± 3.38	23.86 ± 0.23
RPL32	21.67 ± 0.54	23.24 ± 1.69	21.00 ± 0.58	22.12 ± 1.85	30.16 ± 4.46	21.03 ± 0.11
TATA-box	24.52 ± 0.75	26.32 ± 1.88	23.23 ± 1.16	26.46 ± 2.26	32.82 ± 4.92	23.41 ± 0.72
TAF	23.69 ± 0.51	25.52 ± 1.64	23.09 ± 0.40	24.43 ± 2.17	30.71 ± 3.48	22.84 ± 0.39
UBQ	20.92 ± 0.60	21.69 ± 1.42	19.86 ± 1.10	21.47 ± 2.36	29.76 ± 4.08	20.51 ± 0.49
SDHA	18.26 ± 1.63	21.61 ± 2.19	18.29 ± 0.42	19.60 ± 2.12	28.05 ± 4.62	19.53 ± 0.56

组织：成虫头、胸、腹 Head, thorax, abdomen of adult；温度：15, 18, 21, 24, 27 和30℃分别处理2 h 的成虫 Adults exposed to 15, 18, 21, 24, 27 and 30℃ for 2 h, respectively；性别：雌、雄成虫 Female and male adults；杀虫剂处理：分别用0.39 μmol/L 吡虫啉、0.12 μmol/L 阿维菌素、0.34 μmol/L 辛硫磷、0.22 μmol/L 功夫菊酯及 0.52 μmol/L 灭多威处理 1 h 的成虫 Adults exposed to 0.39 μmol/L imidacloprid, 0.12 μmol/L abamectin, 0.34 μmol/L phoxim, 0.22 μmol/L lambda-cyhalothrin and 0.52 μmol/L methomyl for 1 h, respectively；龄期：1 – 5 龄期若虫及 3 日龄成虫 1st – 5th instar nymph and 3-day old adult；功夫菊酯抗性：将羽化 3 日龄成虫用能杀死种群 60% 的功夫菊酯进行处理,24 h 后存活的个体进行继代饲养,在室内连续筛选 14 代,选取敏感品系 S,抗性品系 R6 和 R14. The 3-day old adults were exposed to lambda-cyhalothrin at a concentration which can cause 60% mortality of population, the survived ones after 24 h were kept consecutively and selected after 14 generations. The susceptible strain S, and the resistant strains (R6, R14) of *L. pratensi* were chosen for experiments. 下同 The same below.

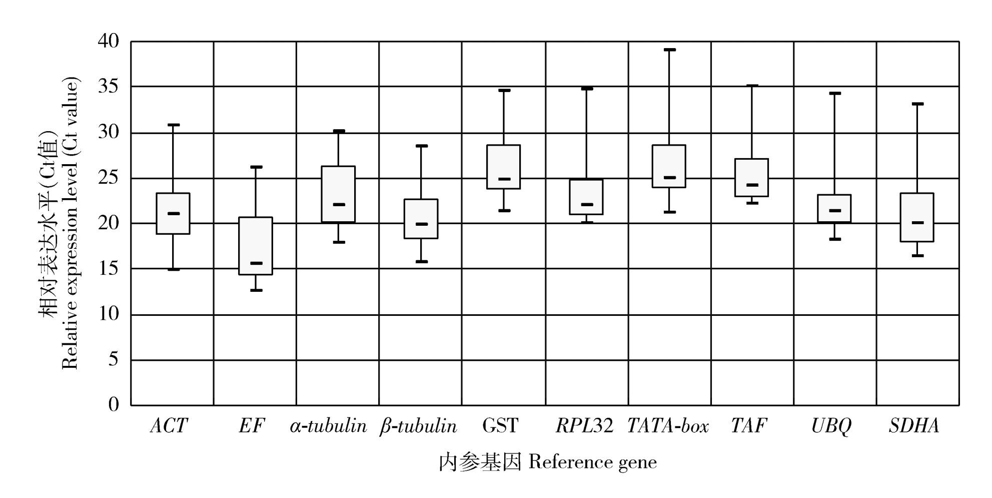


图 1　不同样品或处理下牧草盲蝽各候选内参基因的表达水平

Fig. 1　Expression levels of candidate reference genes in *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments

牧草盲蝽候选内参基因表达水平由不同样品(处理)(见表 2)下的原始 Ct 值表示。箱型上下线分别为上四分位数和下四分位数,中线为中位数,中垂线的上下限分别为最大值和最小值。The expression level was shown in terms of the raw cycle threshold number (Ct value) of the candidate reference genes of *L. pratensis* in different samples or under different treatment conditions (see Table 2). The box represents the values between the 25th and 75th percentiles, the line in the box indicates the median value, and the whisker caps denote the minimal to maximal value.

α-tubulin > *UBQ* > *SDHA* > *TATA-box* > *RPL32* > *GST* > *TAF* > *ACT* > *β-tubulin* > *EF*；不同龄期组 M 值排序为：*α-tubulin* > *TATA-box* > *EF* > *ACT* > *β-tubulin* > *RPL32* > *SDHA* > *GST* > *TAF* > *UBQ*；不同功夫菊酯抗性成虫组 M 值排序为：*α-tubulin* > *SDHA* > *TATA-box* > *ACT* > *UBQ* > *β-tubulin* > *TAF* > *EF* > *RPL32* > *GST*(表 4 和 6)。

2.4　应用 NormFinder 软件分析候选内参基因的表达稳定性

经 NormFinder 软件分析可以看出,牧草盲蝽不同样品或在不同处理下,最稳定表达的基因均不相同。在不同成虫组织中、不同温度处理组、不同性别成虫中、不同杀虫剂处理成虫中、不同龄期组、不同功夫菊酯抗性成虫中,最稳定表达的基因分别为 *RPL32*,

表 3 BestKeeper 计算候选内参基因在牧草盲蝽不同样品或处理下的表达稳定性(*SD* ± [CP])
Table 3 Expression stability (*SD* ± [CP]) of candidate reference genes in *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments calculated by BestKeeper

基因 Gene	组织 Tissue	温度 Temperature	性别 Sex	杀虫剂处理 Insecticide treatment	龄期 Developmental stage	功夫菊酯抗性 Lambda-cyhalothrin resistance
ACT	1.24	1.58	1.17	2.46	2.44	0.75
EF	0.63	2.05	0.40	2.30	3.07	0.30
α-tubulin	1.01	1.97	0.97	3.07	3.18	0.98
β-tubulin	0.93	1.51	0.42	2.18	2.48	0.62
GST	0.56	1.54	0.37	2.53	2.55	0.21
RPL32	0.43	1.29	0.41	1.68	3.26	0.08
TATA-box	0.69	1.68	1.07	2.10	3.49	0.61
TAF	0.44	1.34	0.33	2.06	2.50	0.34
UBQ	0.49	1.08	0.94	2.00	2.99	0.46
SDHA	1.48	1.83	0.39	1.88	3.37	0.48

表 4 geNorm 计算候选内参基因在牧草盲蝽不同样品或处理下的表达稳定性(M)
Table 4 Expression stability (M) of candidate reference genes in *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments calculated by geNorm

基因 Gene	组织 Tissue	温度 Temperature	性别 Sex	杀虫剂处理 Insecticide treatment	龄期 Developmental stage	功夫菊酯抗性 Lambda-cyhalothrin resistance
ACT	1.931	2.182	1.430	1.103	4.095	0.876
EF	0.999	2.824	0.800	0.995	4.235	0.640
α-tubulin	1.418	2.535	1.107	1.631	5.267	1.164
β-tubulin	1.163	2.236	0.992	1.004	4.027	0.750
GST	1.293	2.477	0.808	1.139	3.385	0.621
RPL32	0.974	2.316	0.879	1.173	3.621	0.621
TATA-box	1.214	2.483	1.743	1.276	4.322	1.006
TAF	0.949	2.342	0.843	1.114	3.333	0.659
UBQ	1.161	2.104	1.172	1.565	3.315	0.870
SDHA	1.686	2.286	0.799	1.413	3.494	1.021

表 5 NormFinder 计算候选内参基因在牧草盲蝽不同样品或处理下的表达稳定性
Table 5 Expression stability of candidate reference genes in *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments calculated by NormFinder

基因 Gene	组织 Tissue	温度 Temperature	性别 Sex	杀虫剂处理 Insecticide treatment	龄期 Developmental stage	功夫菊酯抗性 Lambda-cyhalothrin resistance
ACT	1.250	0.947	0.666	0.574	2.363	0.460
EF	0.271	1.755	0.209	1.387	2.426	0.113
α-tubulin	0.823	1.425	0.707	1.257	3.184	0.734
β-tubulin	0.564	1.039	0.452	0.144	2.276	0.293
GST	0.643	1.410	0.087	0.384	1.348	0.139
RPL32	0.158	1.151	0.372	0.630	1.822	0.134
TATA-box	0.523	1.293	1.157	0.860	2.630	0.622
TAF	0.180	1.204	0.128	0.407	1.301	0.197
UBQ	0.471	0.879	0.822	1.204	1.349	0.479
SDHA	1.034	1.146	0.087	0.789	1.606	0.588

表 6 不同样品或处理下牧草盲蝽候选内参基因表达稳定性排名

Table 6 Expression stability ranking of candidate reference genes in *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments

组别 Group	内参基因 Reference gene	BestKeeper	geNorm	NormFinder
组织 Tissue	*ACT*	9	10	10
	EF	5	3	3
	α-tubulin	8	8	8
	β-tubulin	7	5	6
	GST	4	7	7
	RPL32	1	2	1
	TATA-box	6	6	5
	TAF	2	1	2
	UBQ	3	4	4
	SDHA	10	9	9
功夫菊酯抗性 Lambda-cyhalothrin resistance	*ACT*	9	7	6
	EF	3	3	1
	α-tubulin	10	10	10
	β-tubulin	8	5	5
	GST	2	1	3
	RPL32	1	2	2
	TATA-box	7	8	9
	TAF	4	4	4
	UBQ	5	6	7
	SDHA	6	9	8
温度 Temperature	*ACT*	6	2	2
	EF	10	10	10
	α-tubulin	9	9	9
	β-tubulin	4	3	3
	GST	5	7	8
	RPL32	2	5	5
	TATA-box	7	8	7
	TAF	3	6	6
	UBQ	1	1	1
	SDHA	8	4	4
性别 Sex	*ACT*	10	9	7
	EF	4	2	4
	α-tubulin	8	7	8
	β-tubulin	6	6	6
	GST	2	3	1
	RPL32	5	5	5
	TATA-box	9	10	10
	TAF	1	4	3
	UBQ	7	8	9
	SDHA	3	1	1
杀虫剂处理 Insecticide treatment	*ACT*	8	3	4
	EF	7	1	10
	α-tubulin	10	10	9
	β-tubulin	6	2	1
	GST	9	5	2
	RPL32	1	6	5
	TATA-box	5	7	7
	TAF	4	4	3
	UBQ	3	9	8
	SDHA	2	8	6

续表 6 Table 6 continued

组别 Group	内参基因 Reference gene	BestKeeper	geNorm	NormFinder
龄期 Developmental stage	*ACT*	1	7	7
	EF	6	8	8
	α-tubulin	7	10	10
	β-tubulin	2	6	6
	GST	4	3	2
	RPL32	8	5	5
	TATA-box	10	9	9
	TAF	3	2	1
	UBQ	5	1	3
	SDHA	9	4	4

UBQ, *GST*, *β-tubulin*, *TAF* 和 *EF*(表 5 和 6)。

2.5 应用 RefFinder 分析候选内参基因的表达稳定性

一般 RefFinder 分析值越低,表达越稳定。在牧草盲蝽成虫不同组织中内参基因表达稳定性排序依次为:*RPL32* > *TAF* > *EF* > *UBQ* > *TATA-box* > *β-tubulin* > *GST* > *α-tubulin* > *SDHA* > *ACT*(图 2: A);对功夫菊酯不同抗性组其表达稳定性排序为:*RPL32* > *GST* > *EF* > *TAF* > *β-tubulin* > *UBQ* > *ACT* > *SDHA* > *TATA-box* > *α-tubulin*(图 2: B); 牧草盲蝽成虫在不

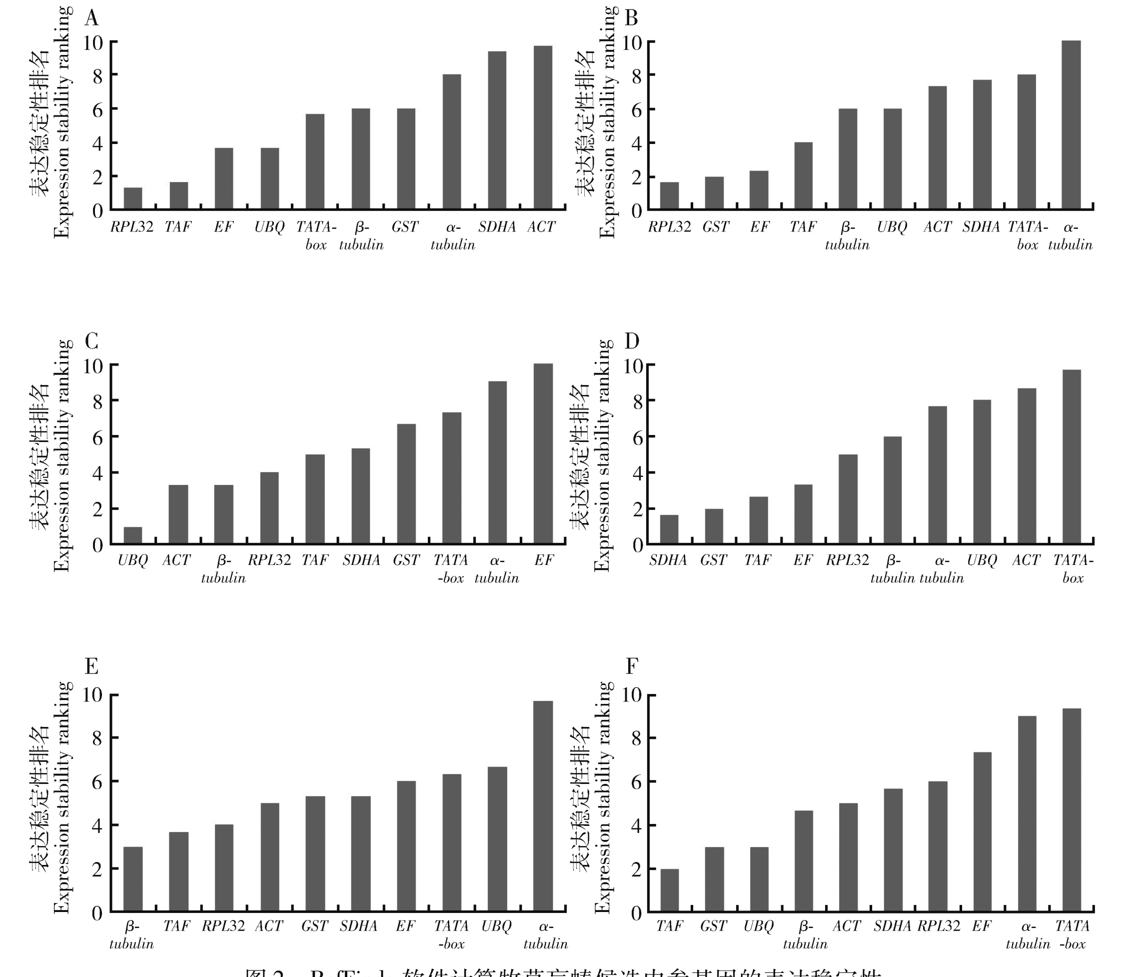


图 2 RefFinde 软件计算牧草盲蝽候选内参基因的表达稳定性

Fig. 2 Expression stability of the candidate reference genes in *Lygus pratensis* calculated by RefFinder

A: 成虫不同组织 Different adult tissues; B: 对功夫菊酯不同抗性成虫 Adults with different lambda-cyhalothrin resistance; C: 不同温度处理成虫 Adults exposed to different temperatures; D: 不同性别成虫 Adults of different sexes; E: 不同杀虫剂处理成虫 Adults exposed to different insecticides; F: 不同龄期 Different developmental stages. 排名较低则表达稳定性较高。Lower ranking value indicates more stable expression.

同温度处理下，内参基因表达稳定性的排序为：*UBQ* > *ACT* > *β-tubulin* > *RPL32* > *TAF* > *SDHA* > *GST* > *TATA-box* > *α-tubulin* > *EF*（图 2：C）；不同性别成虫组排序为：*SDHA* > *GST* > *TAF* > *EF* > *RPL32* > *β-tubulin* > *α-tubulin* > *UBQ* > *ACT* > *TATA-box*（图 2：D）；不同杀虫剂处理组排序为：*β-tubulin* > *TAF* > *RPL32* > *ACT* > *GST* > *SDHA* > *EF* > *TATA-box* > *UBQ* > *α-tubulin*（图 2：E）；不同龄期组排序为：*TAF* > *GST* > *UBQ* > *β-tubulin* > *ACT* > *SDHA* > *RPL32* > *EF* > *α-tubulin* > *TATA-box*（图 2：F）。

2.6　各组最优内参基因组合的确定

由图 3 可以看出，在牧草盲蝽成虫不同组织中、对功夫菊酯不同抗性成虫中、不同性别成虫中的最佳基因组合数目为 2，结合 RefFinder 综合排序的结果，这 3 组处理后最佳内参基因组合分别为 *RPL32* + *TAF*，*RPL32* + *GST* 和 *SDHA* + *GST*。而不同杀虫剂处理成虫中、不同龄期以及不同温度处理条件下，均为 $V_{n/n+1}$ >0.15，则说明在该条件下，同样需要多种内参基因组合使用，以便更好地分析目标基因的表达。在不同温度处理成虫中、不同杀虫剂处理成虫中和不同龄期组，牧草盲蝽最优内参基因组合分别为：*UBQ* + *ACT* + *β-tubulin*，*β-tubulin* + *TAF* + *RPL32* 和 *TAF* + *GST* + *UBQ*（表 7）。

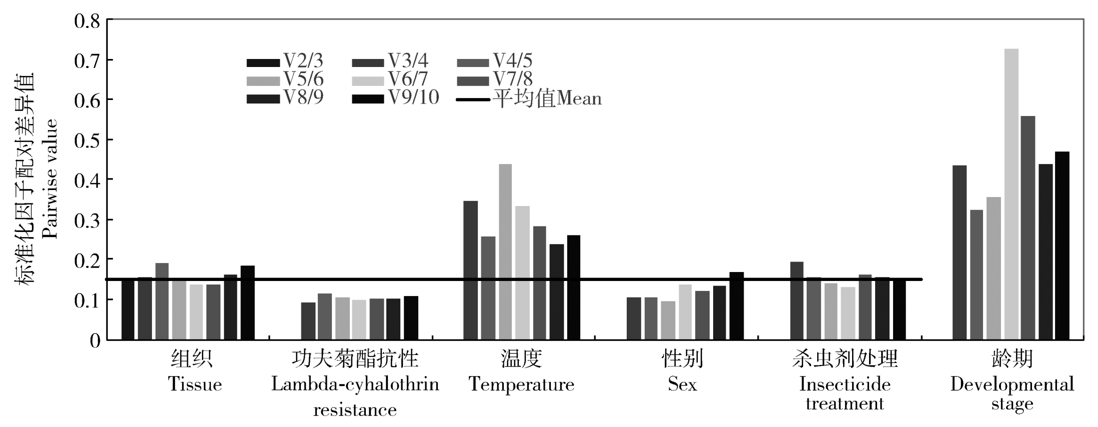


图 3　geNorm 软件计算牧草盲蝽最优内参基因组合

Fig. 3　The optimal combination of reference genes in *Lygus pratensis* calculated by geNorm

表 7　不同样品或处理下牧草盲蝽最优内参基因组合

Table 7　Optimal combination of reference genes in *Lygus pratensis* in different samples or under different treatments

组别 Group	表达最稳定基因 Most stably expressed gene	最优内参基因组合 Optimal combination of reference genes	表达最不稳定基因 Least stably expressed gene
成虫组织 Adult tissue	*RPL32*	*RPL32* + *TAF*	*ACT*
功夫菊酯抗性 Lambda-cyhalothrin resistance	*RPL32*	*RPL32* + *GST*	*α-tubulin*
温度 Temperature	*UBQ*	*UBQ* + *ACT* + *β-tubulin*	*EF*
性别 Sex	*SDHA*	*SDHA* + *GST*	*TATA-box*
杀虫剂处理 Insecticide treatment	*β-tubulin*	*β-tubulin* + *TAF* + *RPL32*	*α-tubulin*
龄期 Developmental stage	*TAF*	*TAF* + *GST* + *UBQ*	*TATA-box*

3　讨论

实时荧光定量 PCR 技术具有灵敏性高、特异性强、快速准确等特点，采用相对定量的方法对目标基因的表达量进行检测，已成为基因表达分析中的标准技术（Guan and Yang, 2008）。为减少试验间的误差影响，选取适当的内参基因能够有效提高试验的准确性及可靠性（Bustin *et al*., 2005, 2009）。但不同试验条件下，不同组织、发育阶段、部位样品的

最适内参基因并不相同。目前国内外学者对多种昆虫都进行过内参基因的筛选(杨顺义等, 2013; Morales *et al*., 2016; Tan *et al*., 2017; 李晓等, 2018),结果均表明不同昆虫最优内参基因并不完全相同。在半翅目昆虫研究中,关于内参基因表达稳定性的研究也有很多报道,如:Yang 等(2014)报道了温度和发育条件对豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 持家基因的表达谱,筛选出 3 条表达相对稳定的持家基因,并建立了豌豆蚜标准化的 qPCR 研究方法;随后又在豇豆蚜 *Aphis craccivora* 上做了内参基因表达及稳定性筛选的研究(Yang *et al*., 2015)。Sinha 和 Smith(2014)通过研究分析了不同抗虫的小麦品系上俄罗斯麦蚜 *Diuraphis noxia* 的内参基因表达谱,并提出了编码 Actin 和 Ribosomal protein L27 蛋白的持家基因可做内参基因进行基因表达相对定量研究的校正因子。Maroniche 等(2011)对被感染病毒的玉米飞虱 *Delphacodes kuscheli* 进行了内参基因表达的研究,发现聚泛素、18S 和 ACT 基因表达相对稳定,被推荐作为内参校正因子,但另外两条常被作为传统内参基因的 *Tubulin* 和 *EF1A* 表达稳定性较差。Bansal 等(2012)经过实验得出结论:TATA 结合蛋白(TATA-box binding protein, TBP),核糖体蛋白 S9(ribosomal protein S9, RPS9)和延伸因子 1A1(elongation factor 1-alpha, EF1a)基因分别在大豆蚜 *Aphis glycines* 不同组织中、不同抗性寄主上大豆蚜中及不同发育阶段大豆蚜中表达稳定,可选作校正因子。还有报道分别在不同杀虫剂处理下(Liang *et al*., 2014),不同光周期和温度处理下(Li *et al*., 2013),以及被病毒感染与否(Lv *et al*., 2018)的烟粉虱 *Bemisia tabaci* 上筛选了稳定表达的基因,并建立了标准的荧光定量 PCR 的检测方法。而关于半翅目盲蝽的内参基因表达研究未见报道,因此,对牧草盲蝽的内参基因进行筛选,对今后开展其相关基因表达的研究,保证表达分析的可靠性有重要的意义。

本研究采用了 BestKeeper, geNorm 和 NormFinder 3 种软件分析方法对牧草盲蝽的 10 条候选内参基因进行了分析,从结果可以看出,采用不同计算方式所得计算的结果并不完全一致,其中 geNorm 与 NormFinder 所筛选的最优内参基因较为一致,这是因为 geNorm 程序通过计算出每个内参基因稳定性的 M 值来筛选出稳定性较好的内参基因,而 NormFinder 的计算原理与 geNorm 相似,但是在运算过程中 NormFinder 是对每一个独立的内参基因进行分析(Fu *et al*., 2013)。而 BestKeeper 是以获得每个基因之间产生配对的相关系数、标准差和变异系数来共同判断,且一次最多评价 10 个基因(陈芳和陆永跃, 2014)。同时我们也发现,不同处理样品之间的最优内参基因存在显著差异,并且,不是传统意义上常用的内参基因就一定会具有稳定的表达效果,这肯定了我们需要在开展牧草盲蝽基因表达分析研究前,进行不同处理内参基因稳定性筛选的必要性。在高通量测序技术发展起来之前,*ACT* 和 *Tubulin* 等传统持家基因经常被作为内参基因和相对定量的校正因子使用(Tan *et al*., 2015; 李晓等, 2018),但是大量的实验结果表明,不同的研究对象,或是相同的研究对象在不同处理下传统意义上的持家基因不一定稳定表达。如 *ACT* 基因,几乎涉及真核细胞的所有生理过程,如细胞分裂、染色体运动、细胞器运动、细胞激化、胞质流动等(焦建华等, 2007),在牧草盲蝽的内参基因筛选结果中,仅在不同温度处理下综合分析后表现出了较高稳定性。He 等(2014)发现 *ACT* 基因在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 不同龄期若虫中的表达稳定性低于其他候选内参基因。Li 等(2013)研究发现在不同温度、光周期及杀虫剂处理下的烟粉虱 *ACT* 基因的表达稳定性在所选内参基因中都相对较低。*Tubulin* 基因编码的微管蛋白参与许多细胞功能,包括维持细胞形态、细胞内运输、鞭毛和纤毛的运动、染色体运动和细胞分裂等(樊东等, 2008)。在牧草盲蝽不同温度、不同杀虫剂处理下,*β-tubulin* 基因的表达稳定性相对较高(表 6),而 *α-tubulin* 基因在所设处理条件下,均显示出较低的表达稳定性。Lord 等(2010)的研究发现,被真菌侵染的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*,其 *α-tubulin* 及 *β-tubulin* 基因的表达都不稳定;Li 等(2013)的研究发现,在几种生物与非生物因素的影响下,*ACT* 和 *γ-tubulin* 的表达稳定性都相对较低。核糖体蛋白参与蛋白质的翻译和合成,有证据表明其编码基因在多种昆虫中能够稳定表达。*RPL*32 基因在不同部位、不同抗性牧草盲蝽中表达稳定性最高,相似的结果出现在很多鞘翅目昆虫的内参基因稳定性筛选结果中(Shi *et al*., 2013; 李晓等, 2018)。但是在不同温度处理、不同杀虫剂处理、不同性别及不同龄期的牧草盲蝽中,*RPL*32 基因的表达稳定性在候选基因中处于中间位置。

本研究通过 geNorm 软件判断配对变异数可以确定内参基因的最佳数目,由于不同杀虫剂处理下,

$V_{n/n+1} > 0.15$，不同龄期以及不同温度处理下，$V_{n/n+1} > 0.15$，有必要再引入一个相对稳定表达的内参基因进行实验。研究中还发现，用不同方法对 10 条候选内参基因表达计算所得的稳定值，在不同温度处理组、不同杀虫剂处理组及不同龄期组中，稳定值相对较大，这说明这 3 种处理对内参基因的稳定表达影响较大。通过研究结果我们还得到另一重要结果：对于不同条件下基因表达的准确性，适当引入内参基因进行校正十分必要，但过多内参基因的使用本身就会引入更多的不稳定因素，使正确度降低（Zhu *et al*., 2014），特别是在加入第 4 个、且表达稳定性在不断下降的内参基因后，校正的精确度下降，所以提出最佳内参基因组合的基因个数不应超过 3（Fu *et al*., 2013）。所以，不同性别、不同杀虫剂处理、不同龄期的牧草盲蝽最优内参基因组合分别为 *SDHA* + *GST* + *TAF*，*β-tubulin* + *TAF* + *RPL*32 和 *TAF* + *GST* + *UBQ*。在实际筛选最优内参基因组合时，我们通常以最多使用 3 条稳定表达的内参基因作为组合进行荧光定量的校正。结合 RefFinder 对使用不同分析方法预测的每条内参基因的表达稳定性进行综合排序，最终确定内参基因的最优选择，避免了单个软件分析的片面性，使筛选结果更加可靠（郑永钦等，2019）。

本研究希望通过对牧草盲蝽内参基因的筛选，为日后应用 qPCR 技术广泛开展该虫的基因表达及功能分析研究奠定了理论基础，并为合理选择牧草盲蝽的内参基因提供借鉴。

参考文献（References）

Bansal R, Mamidala P, Mian MA, Mittapalli O, Michel AP, 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol*., 105(4): 1432-1438.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem*., 55(4): 611-622.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW, 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mol. Endocrinol*., 34(3): 597-601.

Chen F, Lu YY, 2014. Selection of reference genes in *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) under heat stress. *Acta Entomol. Sin*., 57(10): 1146-1154. ［陈芳，陆永跃，2014. 热胁迫下棉花粉蚧内参基因的筛选. 昆虫学报，57(10)：1146-1154］

Dzaki N, Ramli KN, Azlan A, Ishak IH, Azzama G, 2017. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Sci. Rep*., 7: 43618.

Fan D, Qin SB, Piao DH, Xu YL, 2008. Cloning and sequence analysis of two types of tubulin genes from the armyworm *Mythimna separata* Walker. *Plant Prot*., 34(4): 40-45. ［樊东，秦松柏，朴冬花，许艳丽，2008. 黏虫体内两种微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆与序列分析. 植物保护，34(4)：40-45］

Fu W, Xie W, Zhang Z, Wang S, Wu Q, Liu Y, Zhou XM, Zhou XG, Zhang YJ, 2013. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Int. J. Biol. Sci*., 9(8): 792-802.

Guan H, Yang K, 2008. RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR. *Methods Mol. Biol*., 456: 259-270.

Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Wuytswinkel O, Van Wuytswinkel O, 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pit fall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol. J*., 6(6): 609-618.

He XT, Liu CC, Li ZQ, Zhang Z, Li GQ, Li F, Dong SL, 2014. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Laodelphax striatellus*. *J. Intergr. Agr*., 13(4): 811-818.

Jia B, Tan Y, Fu XT, Han HB, Chang J, Pang BP, 2018. Effects of host plants on the development, reproduction and digestive enzyme activity in *Lygus pratensis*. *Pratacul. Sci*., 35(8): 1975-1984. ［贾冰，谭瑶，付晓彤，韩海斌，常静，庞保平，2018. 不同寄主植物对牧草盲蝽生长发育、繁殖及消化酶活性的影响. 草业科学，35(8)：1975-1984］

Jiao JH, Ma L, Zhang DH, 2007. Cloning and sequences of *Aedes albopictus* β-actin gene fragment and its application as an internal control. *J. Pathogen. Biol*., 2(6): 454-456. ［焦健华，马磊，张东辉，2007. 白纹伊蚊 β-肌动蛋白基因片段的克隆及其作为基因表达内参照的应用. 中国病原生物学杂志，2(6)：454-456］

Li RM, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Yang NN, Yang X, Pan HP, Zhou XM, Bai LY, Xu BY, Zhou XG, Zhang YJ, 2013. Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *PLoS ONE*, 8(1): e53006.

Li X, Li JW, Cheng B, Li W, Sun WX, Gao HY, Ju Q, Jiang XJ, Du L, Qu CJ, Qu MJ, 2018. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Sympiezomias velatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Entomol. Sin*., 61(11): 1284-1294. ［李晓，李建文，成波，李伟，孙文秀，高华援，鞠倩，姜晓静，杜龙，曲春娟，曲明静，2018. 大灰象甲实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报，61(11)：1284-1294］

Liang P, Guo YJ, Zhou XG, Gao XW, 2014. Expression profiling in *Bemisia tabaci* under insecticide treatment: indicating the necessity for custom reference gene selection. *PLoS ONE*, 9(1): e87514.

Lord JC, Hartzer K, Toutges M, Oppert B, 2010. Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge. *J. Microbiol. Methods*, 80(2): 219-221.

Lü J, Yang CX, Zhang YJ, Pan HP, 2018. Selection of reference genes for the normalization of RT-qPCR data in gene expression studies in insects: a systematic review. *Front Physiol.*, 9: 1560.

Lu YH, Yuan M, Gao X. W, Kang TH, Zhan S, Wan H, Li JH, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Lv ZH, Pan HP, Zhang W, Ding TB, Chu D, 2018. Reference gene selection for RT-qPCR analysis in two invasive whiteflies after the acquisition of vectored or non-vectored viruses. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 21(1): 19-24.

Maroniche GA, Sagadín M, Mongelli VC, Truol GA, del Vas M, 2011. Reference gene selection for gene expression studies using RT-qPCR in virus-infected planthoppers. *Virol. J.*, 8: 308.

Morales MA, Mendoza BM, Lavine LC, Lavine MD, Walsh DB, Zhu F, 2016. Selection of reference genes for expression studies of xenobiotic adaptation in *Tetranychus urticae*. *Int. J. Biol. Sci.*, 12(9): 1129-1139.

Shi XQ, Guo WC, Wan PJ, Zhou LT, Ren XL, Ahmat T, Fu KY, Li GQ, 2013. Validation of reference genes for expression analysis by quantitative real-time PCR in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *BMC Res. Notes*, 6(1): 93.

Sinha DK, Smith CM, 2014. Selection of reference genes for expression analysis in *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) fed on resistant and susceptible wheat plants. *Sci. Rep.*, 4: 5059.

Sun P, Yang Q, Liu DC, Gou CQ, Feng HZ, 2017. Taxis responses of *Lygus pratensis* to 7 different host plants. *Xinjiang Agric. Sci.*, 54(5): 925-930. [孙鹏, 杨琪, 刘端春, 苟长青, 冯宏祖, 2017. 牧草盲蝽对七种寄主植物的趋性行为反应研究. 新疆农业科学, 54(5): 925-930]

Tan QQ, Zhu L, Li Y, Liu W, Ma WH, Lei CL, Wang XP, 2015. A *de novo* transcriptome and valid reference genes for quantitative realtime PCR in *Colaphellus bowringi*. *PLoS ONE*, 10(2): e0118693.

Tan Y, Wang CY, Meng C, Shi L, Pang BP, 2015. Community composition and diversity of Hemiptera insects on alfalfa in Inner Mongolia. *J. Inner Mongolia Agric. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 36(6): 24-28. [谭瑶, 王春媛, 孟超, 史丽, 庞保平, 2015. 内蒙古地区紫花苜蓿半翅目昆虫群落结构与多样性. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 36(6): 24-28]

Tan Y, Zhou XR, Pang BP, 2017. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bull. Entomol. Res.*, 107(3): 359-368.

Taylor CM, Jost R, Erskine W, Nelson MN, 2016. Identifying stable reference genes for qRT-PCR normalisation in gene expression studies of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *PLoS ONE*, 11(2): e0148300.

Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L, Van Soest S, Vuerinckx K, Huybrechts R, Broeck JV, Simonet G, 2009. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Mol. Biol.*, 10(1): 56.

Wang GH, Zhao WC, Cheng JA, 2008. Real-time fluorescent quantitative PCR technique and its applications in entomological studies. *Acta Entomol. Sin.*, 51(12): 1293-1303. [王光华, 赵伟春, 程家安, 2008. 实时荧光定量 PCR 技术及其在昆虫学研究中的应用. 昆虫学报, 51(12): 1293-1303]

Wang J, Zhao J, Liu YH, 2014. Evaluation of endogenous reference genes in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(12): 1375-1380. [王佳, 赵静, 刘映红, 2014. 柑橘大实蝇内参基因的评估. 昆虫学报, 57(12): 1375-1380]

Wang W, Zhang RF, Liu HY, Zhang Y, Yao J, 2016. Spatial distribution pattern of common meadow bug *Lygus pratensis* (Linnaeus) in Xinjiang cotton fields. *J. Plant Prot.*, 43(6): 972-978. [王伟, 张仁福, 刘海洋, 张瑜, 姚举, 2016. 新疆棉田牧草盲蝽的空间分布规律. 植物保护学报, 43(6): 972-978]

Yang CX, Pan HF, Liu Y, Zhou XG, 2014. Selection of reference genes for expression analysis using quantitative real-time PCR in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphidiae). *PLoS ONE*, 9(11): e110454.

Yang CX, Pan HF, Liu Y, Zhou XG, 2015. Temperature and development impacts on housekeeping gene expression in cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphidiae). *PLoS ONE*, 10(6): e0130593.

Yang MC, Yang T, 2001. Harmfulness and control of *Lygus pratensis* in southern Xinjiang. *Plant Prot.*, 27(5): 31-32. [杨明超, 杨涛, 2001. 牧草盲蝽在南疆的发生危害及其防治. 植物保护, 27(5): 31-32]

Yang SY, Yue XL, Wang JJ, Shen HM, 2013. Screening of suitable reference genes and expression profiling of CYP392E subfamily genes in different resistant strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(10): 1152-1159. [杨顺义, 岳秀利, 王进军, 沈慧敏, 2013. 二斑叶螨不同抗性品系最佳内参基因的筛选及 CYP392E 亚家族基因的表达分析. 昆虫学报, 56(10): 1152-1159]

Zhang JW, Zheng Z, Wang QH, Huang RL, Du XD, 2018. Screening of reference genes for real-time PCR in whole tissue from *Sipunculus nudus*. *J. Guangdong Ocean Univ.*, 38(1): 7-13. [张家炜, 郑哲, 王庆恒, 黄荣莲, 杜晓东, 2018. 光裸星虫全组织荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选. 广东海洋大学学报, 38(1): 7-13]

Zhang L, Gao XW, Liang P, 2007. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89(1): 65-72.

Zhang LJ, Cai WZ, Luo JY, Zhang S, Wang CY, Lv LM, Zhu XZ, Wang L, Cui JJ, 2017. Phylogeographic patterns of *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae): evidence for weak genetic structure and recent expansion in northwest China. *PLoS ONE*, 12(4): e0174712.

Zhang XF, 2014. A preliminary report on the developmental process of *Lygus pratensis*. *Shaanxi J. Agric. Sci.*, 60(2): 43-44. [张孝峰, 2014. 牧草盲蝽个体发育进程研究初报. 陕西农业科学,

60(2)：43 – 44]

Zhang YF, Zhao LJ, Zeng YL, 2014. Selection and application of reference genes for gene expression studies. *Plant Physiol. J.*, 50(8)：1119 – 1125. [张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲, 2014. 基因表达研究中内参基因的选择与应用. 植物生理学报, 50(8)：1119 – 1125]

Zheng YQ, Zheng Z, Chen YL, Huang HX, Xu MR, 2019. Screening and evaluation of reference genes for *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Microbiol. China*, 46(11)：2985 – 2995. [郑永钦, 郑正, 陈燕玲, 黄洪霞, 许美容, 2019. 柑橘黄龙病菌内参基因的筛选与评估. 微生物学通报, 46(11)：2985 – 2995]

Zhu J, Yang CJ, Wang J, 2009. Real-time fluorescent quantitative PCR and application in scientific research. *Biotechnol. Bull.*, (2)：73 – 76. [朱捷, 杨成君, 王军, 2009. 荧光定量 PCR 技术及其在科研中的应用. 生物技术通报, (2)：73 – 76]

Zhu X, Yuan M, Shakeel M, Zhang YJ, Wang SL, Wang X, Zhan S, Kang TH, Li JH, 2014. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 9(1)：e84730.

（责任编辑：马丽萍）